PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/00447 G01N 33/566, 33/76, 33/564 A1 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. Januar 1997 (03.01.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP96/02649

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. Juni 1996 (19.06.96)

(30) Prioritätsdaten:

195 22 171.0

19. Juni 1995 (19.06.95)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Komturstrasse 19-20, D-12099 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US); BERGMANN, Andreas [DE/DE]; Baumläuferweg 47, D-12351 Berlin (DE).

(74) Anwälte: ANDRAE, Steffen; Andrae, Flach, Haug, Kneissl, Balanstrasse 55, D-81541 München (DE) usw.

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT. SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESS FOR DETERMINING AUTO-ANTIBODIES AGAINST ANTI-TSH-RECEPTOR AUTO-ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ANTI-TSH-REZEPTOR-AUTOANTIKÖRPERN

(57) Abstract

A process is disclosed for determining auto-antibodies against anti-TSH-receptor auto-antibodies in a human serum or plasma sample. Thus the auto-antibodies to be determined in the sample compete with a TSH-competitor that may be labelled with an appropriate label for the binding sites of a solubilised TSH-receptor. The amount of auto-antibodies to be determined is calculated from the amount of competitor bound to the TSH-receptor or extracted from the liquid phase. In order to prepare the reaction mixture, the sample, the optionally labelled TSH-competitor and the TSH-receptor are simultaneously mixed and the thus obtained reaction mixture is subjected to one-stage incubation then processed in a manner known per se.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer humanen Serum- oder Plasmaprobe, bei dem man die zu bestimmenden Autoantikörper der Probe ggf. mit einem geeigneten Label markierten TSH-Kompetitor um die Bindungsstellen eines solubilisierten TSH-Rezeptors konkurrieren läßt und anhand der Menge des an diesen TSH-Rezeptor gebundenen oder aus der Flüssigphase extrahierten Kompetitors auf die Menge der zu bestimmenden Autoantikörper zurückrechnet, wobei man zur Bereitung der Reaktionsmischung die Probe, den ggf. markierten TSH-Kompetitor und den TSH-Rezeptor im wesentlichen gleichzeitig zusammengibt und die so erhaltene Reaktionsmischung einer einstufigen Inkubation unterwirft und dann auf an sich bekannte Weise aufarbeitet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	2437	:
AT	Österreich	GE	Georgien	MX	Mexiko
ΑÜ	Australien	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Griechenland	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungam	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	IE	Irland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	IT	Italien	PL	Polen
BJ	Benin	JР	Japan	PT	Portugal
BR	Brasilien	KE	Kenya	RO	Rumānien
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	KP		SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KZ	Republik Korea	SG	Singapur
CH	Schweiz	_	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CS	Tschechoslowakei	LK	Litauen	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland	LV	Lettland	ТJ	Tadschikistan
DK	Danemark	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
EE	Estland	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES		MG	Madagaskar	UG	Uganda
FI	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FR	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi	- • •	· realiza

5

10 Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur klinischen Diagnose von Schilddrüsen-Autoimmunerkrankungen, und insbesondere ein verbessertes Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer humanen Serumoder Plasmaprobe mit Hilfe eines sogenannten Rezeptor-Assays.

20

25

15

Im Rahmen der Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen hat die Bestimmung von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor ("Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern") erhebliche Bedeutung. Der TSH-Rezeptor spielt im Rahmen der Regulierung der Funktion der Schilddrüse eine zentrale Rolle. Durch Bindung des von der Hypophyse ausgeschütteten Hormons TSH (Thyrotropin) an den in der Schilddrüsenmembran verankerten TSH-Rezeptor wird nämlich die Bildung und Ausschüttung des wichtigsten Schilddrüsenhormons Thyroxin (T4) stimuliert.

- 30

35

An diesen TSH-Rezeptor können jedoch auch bei bestimmten Krankheitszuständen gebildete Autoantikörper binden, die nachfolgend in ihrer Gesamtheit als Anti-TSH-Rezeptor-Auto-antikörper bezeichnet werden. Je nach Art dieser Autoanti-körper kann es entweder zur Abschirmung der Bindung der TSH-

Moleküle an den TSH-Rezeptor und damit zu einer Inhibierung der Bildung und Ausschüttung von Thyroxin kommen oder im Gegenteil dazu, daß dieses Schilddrüßenhormon unkontrolliert ausgeschüttet wird, weil die Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörper bei ihrer Bindung an den TSH-Rezeptor die Wirkung des TSH simulieren und die Synthese und Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen stimulieren. Der im letzteren Falle resultierende Schilddrüsenhormonüberschuß äußert sich u.a. als eine Hyperthyreose vom Typ Morbus Basedow.

10

15

5

Die Bedeutung von Autoantikörpern gegen den TSH-Rezeptor wird in zahlreichen wissenschaftlichen Veröffentlichungen ausführlich diskutiert, wobei stellvertretend auf den Übersichtsartikel von Bernard Rees Smith et al., "Autoantibodies to the Thyrotropin Receptor", in: Endocrine Reviews, Vol. 9, No.1, 1988, S. 106 bis 121 verwiesen werden kann.

20

25

30

Wegen der Wichtigkeit des Nachweises von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in der klinischen Praxis werden von verschiedenen Diagnostikafirmen derartige Bestimmungsverfahren in Form von Kits angeboten. Alle derartigen gegenwärtig kommerziell angebotenen Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern arbeiten dabei nach dem Prinzip des sogenannten Radiorezeptor-Assays (RRA), bei dem man zur Bestimmung der gesuchten Autoantikörper in einer Serum- oder gegebenenfalls auch Plasmaprobe so vorgeht, daß man die zu gegebenfalls in einer Serum- oder Plasmaprobe vorhandenen Autoantikörper mit einem zugesetzten ¹²⁵I-markierten TSH-Präparat um die Bindungsstellen eines ebenfalls zugesetzten TSH-Rezeptors konkurrieren läßt, der durch Extraktion und Solubilisierung aus einem humanen oder tierischen Schilddrüsenmaterial, in der Regel aus Schilddrüsenmaterial vom Schwein, gewonnen wurde.

35

Alle Bestimmungsverfahren werden dabei nach ein und demselben Inkubationsschema durchgeführt, das im wesentlichen die folgenden Schritte umfaßt:

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Integnationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/00447

G01N 33/566, 33/76, 33/564

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

3. Januar 1997 (03.01.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP96/02649

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. Juni 1996 (19.06.96)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,

PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

195 22 171.0

19. Juni 1995 (19.06.95)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Komturstrasse 19-20, D-12099 Berlin (DE),

(72) Erfinder: und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGMANN, Andreas [DE/DE]; Baumläuferweg 47, D-12351 Berlin (DE).

(74) Anwälte: ANDRAE, Steffen; Andrae, Flach, Haug, Kneissl, Balanstrasse 55, D-81541 München (DE) usw.

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESS FOR DETERMINING AUTO-ANTIBODIES AGAINST ANTI-TSH-RECEPTOR AUTO-ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ANTI-TSH-REZEPTOR-AUTOANTIKÖRPERN

(57) Abstract

A process is disclosed for determining auto-antibodies against anti-TSH-receptor auto-antibodies in a human serum or plasma sample. Thus the auto-antibodies to be determined in the sample compete with a TSH-competitor that may be labelled with an appropriate label for the binding sites of a solubilised TSH-receptor. The amount of auto-antibodies to be determined is calculated from the amount of competitor bound to the TSH-receptor or extracted from the liquid phase. In order to prepare the reaction mixture, the sample, the optionally labelled TSH-competitor and the TSH-receptor are simultaneously mixed and the thus obtained reaction mixture is subjected to one-stage incubation then processed in a manner known per se.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer humanen Serum- oder Plasmaprobe, bei dem man die zu bestimmenden Autoantikörper der Probe ggf. mit einem geeigneten Label markierten TSH-Kompetitor um die Bindungsstellen eines solubilisierten TSH-Rezeptors konkurrieren läßt und anhand der Menge des an diesen TSH-Rezeptor gebundenen oder aus der Flüssigphase extrahierten Kompetitors auf die Menge der zu bestimmenden Autoantikörper zurückrechnet, wobei man zur Bereitung der Reaktionsmischung die Probe, den ggf. markierten TSH-Kompetitor und den TSH-Rezeptor im wesentlichen gleichzeitig zusammengibt und die so erhaltene Reaktionsmischung einer einstufigen Inkubation unterwirft und dann auf an sich bekannte Weise aufarbeitet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

ΑM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niger Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	
BE	Belgien	HU	Ungam	NZ	Norwegen
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Neusceland
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Polen
ВJ	Benin	JР	Japan		Portugal
BR	Brasilien	KE	Kenya	RO	Rumanien
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	KP		SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KZ	Republik Korea Kasachstan	SG	Singapur
CH	Schweiz	u		SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LK	Liechtenstein	SK	Słowakei
CM	Kamerun		Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CS	Tschechoslowakei	LK	Litauen	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DK	Dānemark .	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
EE	Estland	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES		MG	Madagaskar	UG	Uganda
FI	Spanien Finnland	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FR		MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
GA	Frankreich	MR	Mauretanien	. VN	Vietnam
GA.	Gabon	MW	Malawi		

WO 97/00447

5

15

25

30

- 1. Pipettieren der Probe (des Patientenserums) in ein Teströhrchen,
- Zugeben des solubilisierten TSH-Rezeptors in der für den jeweiligen Kit vorgesehenen Form, und Durchmischen,
- 3. Vorinkubieren der gebildeten Reaktionsmischung, die die Bestandteile der Probe sowie den TSH-Rezeptor enthält, für einen Zeitraum von in der Regel 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur,
- 4. danach Zugeben des markierten TSH-Präparats als Tracer,
- Inkubieren der nunmehr alle Testbestandteile enthaltenden Reaktionsmischung für einen Zeitraum in der Größenordnung von zwei Stunden ± 30 Minuten bei Raumtemperatur,
 - 6. Zugeben eines Fällungsreagenz, in der Regel von Polyethylenglykol (PEG) zur Ausfällung des TSH-Rezeptors mit den daran gebundenen Anteilen des Tracers sowie ggf. der Autoantikörper,
 - 7. Zentrifugieren und Abtrennen des flüssigen Überstands von der festen Phase sowie
- 20 8. Messen der Radioaktivität in der festen Phase.

Für die Auswertung der Meßergebnisse werden Eichkurven verwendet, die genau nach dem gleichen Verfahren erstellt werden, nur daß man anstelle der Serumproben die dem Kit beigefügten Standards bzw. Kontrollen einsetzt. Letztere können als "Proben" bekannter Zusammensetzung angesehen werden.

- Wenn im Rahmen der vorliegenden Patentanmeldung von "Probe" gesprochen wird, ist somit nicht nur die aus einem Patienten gewonnene Serum- oder Plasmaprobe gemeint, sondern alles im Hinblick auf die Probe Gesagte gilt genauso für die Messung der Standardlösungen und Kontrollproben.
- Daß nach dem gegenwärtigen Stand der Technik bei Radiorezeptor-Assays zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern ausnahmslos nach der beschriebenen Arbeitsweise ge-

5

10

15

30

arbeitet wird, läßt sich anhand der Arbeitsanweisungen aller diesseits bekannten einschlägigen Testkits belegen, nämlich:

Arbeitsanleitung TRAK-Assay® der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH, Berlin, Januar 1995, insbesondere Meßprinzip gemäß den inneren Umschlagseiten sowie Abschnitt "Testdurchführung";

Arbeitsanleitung TSH REZAK® der Fa. Medipan Diagnostika Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, Selchow, Abschnitt "Testdurchführung", (Stand 1.12.1994);

Gebrauchsinformation THYBIA-Assay der Fa. Byk-Sangtec Diagnostica GmbH & Co. KG, Dietzenbach, 1993, Abschnitt "Testablauf";

Herstellerinformation TSH RECEPTOR ANTIBODY (TRAb) KIT der Fa. KRONUS®, San Clemente, USA, 1993, insbesondere S.6, "Assay Protocol";

- Herstellerinformation "Thyrotropin Receptor Autoantibodies", der Fa. Gesellschaft für Immunchemie und Immunbiologie mbH, Hamburg, Januar 1993, insbesondere Abschnitt 6;
- Herstellerinformation TBIAb RRA der Fa. BIOCODE s.a., Sclessin, Belgien, April 1991, insbesondere Abschnitte 4.2 und 8.2;

Japanische Gebrauchsanleitung "TRAb" der Fa. RSR Limited, Cardiff, UK, 1994, insbesondere Abschnitt 2. Ziffer 4;

Herstellerinformation ANTI R-TSH der Fa. Immunotech, Frankreich, insbesondere Abschnitt 7. SCHEMA OPERATOIRE DU DOSAGE;

Herstellerinformation TRAB ¹²⁵I der Fa. Techland, Sept. 1992, insbesondere S.5 und 8.

5

10

15

20

25

35

Bei allen beschriebenen Verfahren wird es als erforderlich angesehen, die Reaktionsmischung zur Durchführung der eigentlichen Konkurrenz-Meßreaktion zweistufig zu bereiten, nämlich durch Zusammengeben der TSH-Rezeptor-Präparation mit der Probe und eine Vorinkubation der einen Teil des Reaktionssystems enthaltenden Reaktionslösung als erste Stufe, um eine Vorreaktion des TSH-Rezeptors mit den gesuchten Autoantikörpern zu ermöglichen, sowie, als zweite Stufe, durch zeitlich verzögerte Zugabe des als Tracer zugesetzten konkurrierenden TSH-Präparats nach Abschluß der Vorinkubation.

Nachdem auch der Tracer zugesetzt wurde, wird noch einmal für einen längeren Zeitraum, in der Regel von 2h bei Raumtemperatur oder von 1h bei 37 °C, eine Reaktionsmischung inkubiert, die nunmehr alle Umsetzungspartner enthält.

Eine Vorinkubation der genannten Art wird im gesamten Stand der Technik durchgeführt, wobei beispielsweise auf die folgenden Literaturstellen verwiesen werden kann:

- S. Qasim Mehdi et al., in: Biochem. J. (1975) 145, S. 105-111, insbesondere S. 107, Abschnitt "Standard procedure for the assay of LATS in human sera or IgG";
- H. Schleusener et al., J.Endocrinol.Invest. 2: S.155-161,
 (1978);
- J. Haberman, C.R. Pickardt und P.C. Scriba, Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl. 234, 26 (1980);

Bernard Rees Smith and Reginald Hall, "Measurement of Thyrotropin Receptor Antibodies" in: Methods in Enzymology, Vol. 74 (1981), S. 405-420, insbesondere S. 415, "Assay Procedure", S. 417, Zeilen 1-5 des Textes von unten;

Kay Southgate et al., in Clinical Endocrinology (1984), 20,

S. 539-548, insbesondere S. 541, Abschnitt "Assay procedure for unextracted serum";

Haruo Tamaki et al., in: J.Clin.Lab.Immunol. (1986), 20, S.1-6; insbesondere S.2, Abschnitt "Assay Procedure for Unextracted Sera":

5

10

15

20

S. Costagliola et al., "Binding Assay for Thyrotropin Receptor Autoantibodies Using the Recombinant Receptor Protein" in: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 78, No.6, (1992) S. 1540-1544, insbesondere S. 1541, Abschnitt "Binding Assay for autoantibody determinations";

Manjula K. Gupta in: Clin. Biochem., Vol. 25, 1992, S. 193-199, insbesondere S. 194, linke Spalte.

Die angeführten Literaturstellen decken einen Zeitraum von 20 Jahren ab, wobei gemäß den älteren Literaturstellen die Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörper auch als LATS (long-acting thyroid stimulator) oder TBII (TSH-binding inhibitor immunoglobulin) bezeichnet werden. Eine in der Literatur zu findende Abkürzung ist auch TRAb (thyrotropin (TSH)-receptor antibodies).

Die frühesten einschlägigen Verfahren arbeiteten stets mit 25 Schilddrüsenmembranen als Rezeptor-Präparation sowie vorzugsweise mit isolierten Immunglobulin-Fraktionen als Probenmaterial. Dabei wird schon in der ältesten der oben aufgeführten Arbeiten eine Vorinkubation von drei Stunden bei 23 bis 25 °C durchgeführt. In der o.g. Literaturstelle 30 J. Haberman, C.R. Pickardt und P.C. Scriba, Acta Endocrinol. Copenhagen) Suppl. 234, 26 (1980) wird dann ausdrücklich auf die Bedeutung der Vorinkubation hingewiesen, indem gezeigt wird, daß eine 60-minütige Vorinkubation gegenüber einer Arbeitsweise ohne eine derartige Vorinkubation zu deutlich 35 verbesserten Meßergebnissen führt. In dem o.g. maßgeblichen Artikel "Measurement of Thyrotropin Receptor Antibodies" von

7

Bernard Rees Smith und Reginald Hall wird auf S. 417 ebenfalls die Bedeutung der Vorinkubation für ein zuverlässiges Meßverfahren hervorgehoben.

Auch als für Radiorezeptor-Assays zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern verbesserte Reagenzien eingeführt wurden und das Meßprinzip auf Serumproben anstelle von isolierten IgG-Fraktionen ausgedehnt wurde, änderte sich am grundsätzlichen Reaktionsschema mit Vorinkubation nichts. Es kann in diesem Zusammenhang auf diejenigen der obigen Veröffentlichungen, einschließlich aller Arbeitsanleitungen, verwiesen werden, die aus den letzten zehn Jahren stammen.

5

10

15

20

25

30

35

Auch die Anmelderin selbst schreibt noch in ihrer Arbeitsanleitung für ihren TRAK-Assay® aus dem Jahre 1995 die
übliche 15- bis 20-minütige Vorinkubation bei Raumtemperatur
vor. Eine derartige Vorinkubation wird auch in allen
Patenten der Anmelderin, die die Bestimmung von Anti-TSHRezeptor-Autoantikörpern betreffen, durchgeführt, nämlich in
dem deutschen Patent DE 42 37 430, Beschreibung der Testdurchführung nach Zeile 62 von Seite 4, sowie im deutschen
Patent DE 43 28 070, das ein abgewandeltes Verfahren
betrifft, bei dem mit einem unmarkierten Kompetitor (bTSH)
gearbeitet wird, und zwar im Versuch 3 des zuletzt genannten
Patents.

Das deutsche Patent DE 42 37 430 betrifft einen Tracer in Form eines radioaktiv markierten TSH, der durch direkte Radiojodierung eines durch Aufreinigung aus crudem bovinem TSH gewonnenen TSH-Präparats, das eine biologischen Aktivität von mehr als 40 IE TSH/mg Protein aufweist und erhältlich ist durch affinitätschromatographische Reinigung von handelsüblichem crudem bovinem TSH an einer anti-TSH-Antikörper-Säule und anschließende Ionenaustausch-Chromatographie an einem schwach sauren Kationenaustauscher mit endständigen Carboxylgruppen auf der Basis eines polyamidbeschichteten Kieselgels, erhalten wurde. Dieser Tracer stellt

Reaktionsmischung unter Anwendung einer zwischengeschalteten Vorinkubation von 15 bis 60 min stellt sich jedoch in der Routinepraxis des Diagnostiklabors als eine erhebliche Erschwernis der Testdurchführung und mögliche zusätzliche Fehlerquelle dar.

10

15

20

25

30

35

Der vorliegenden Erfindung liegt nunmehr die überraschende Feststellung zugrunde, daß die bisher einhellig als nötig angesehene Vorinkubation bei den gegenwärtigen Testverfahren unter Verwendung der im Handel befindlichen verbesserten Reagenzien gar nicht mehr erforderlich ist, sondern daß es möglich ist, auf die Vorinkubation zu verzichten und in diesem Zusammenhang auch die Folge der Pipettierschritte zu verändern, ohne daß die erhaltenen Meßergebnisse negativ beeinflußt werden.

Die folgende Erfindung betrifft somit ein an sich bekanntes Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern gemäß Oberbegriff von Patentanspruch 1, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man zur Bereitung der Reaktionsmischung die Probe, das markierte TSH-Präparat und den TSH-Rezeptor im wesentlichen gleichzeitig zusammengibt und die so erhaltene Reaktionsmischung einer einstufigen Inkubation unterwirft, wobei man bei einer Pipettierung von Hand vorzugsweise so vorgeht, daß man zur Bereitung der Reaktionsmischung zuerst die Probe und das markierte TSH-Präparat zusammengibt und die Reaktion durch anschließende Zugabe des TSH-Rezeptors startet, wonach man auf an sich übliche Weise inkubiert und aufarbeitet.

Bei einer Testdurchführung mit Hilfe von Pipettierautomaten kann aber z.B. auch so vorgegangen werden, daß Probe, TSH-

9

Rezeptor und markiertes TSH-Präparat nacheinander in der angegebenen Reihenfolge von einer Sondennadel angesaugt und gemeinsam in ein übliches Probengefäß abgegeben werden.

Das neue Inkubations- und Pipettierschema kann auch bei einem Verfahren zur Anwendung kommen, wie es im Patent DE 43 28 070 der Anmelderin beschrieben ist, bei dem man die eigentliche Konkurrenzreaktion mit einem unmarkierten TSH-Präparat durchführt und zur Bestimmung der Anwesenheit und Menge von Autoantikörpern in einer Probe anschließend die in der flüssigen Phase verbliebenen unumgesetzten TSH-Moleküle nach einem Sandwich-Verfahren bestimmt.

Diese Verfahrensvariante wird durch den nebengeordneten Anspruch 7 speziell erfaßt.

15

20

Das neuartige "Einschritt-Bestimmungsverfahren" mit nur einer einzigen gleichzeitigen Inkubation aller Reaktionsteilnehmer ergab zur eigenen Überraschung der Anmelderin bei einem entsprechenden Testversuch mit dem eigenen kommerziellen Kit für den TRAK-Assay® Ergebnisse, die denen gleichwertig waren, die mit den gleichen Reagenzien nach der üblichen Arbeitsweise erhalten wurden.

Es wird angenommen, daß durch die in der Zwischenzeit gegenüber der ursprünglichen Verfahrensführung unter Verwendung
von z.B. Schilddrüsenmembranen und Immunglobulin-Fraktionen
erzielten Verbesserungen sowie eine verbesserte TracerHerstellung die Vorinkubation überflüssig gemacht wurde,
ohne daß die Fachwelt das für möglich hielt, so daß das
Erfordernis der Vorinkubation noch in Veröffentlichungen der
jüngeren Zeit ausdrücklich hervorgehoben wird.

Die Möglichkeit einer einstufigen Inkubation ist jedoch in der Praxis ein erheblicher Vorteil, und die Möglichkeit einer einstufigen Testdurchführung ist für den Fachmann außerordentlich überraschend.

WO 97/00447

PCT/EP96/02649

Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren dem traditionellen Verfahren unter Verwendung der gleichen Bestandteile des kommerziellen TRAK-Assays® der Anmelderin gegenübergestellt.

5

Dabei wird auf zwei Figuren Bezug genommen, die zeigen:

. .

Fig. 1 die Ergebnisse der Messung der gleichen 100 Patientenseren nach dem herkömmlichen und dem erfindungsgemäßen Verfahren, und

10

Fig. 2 die Standardkurven für Bestimmungsverfahren unter Verwendung der Reagenzien des TRAK-Assays®, wenn einmal nach dem bekannten Verfahren und zum anderen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vorgegangen wurde.

15

Versuchsbeschreibung

1. Reagenzien

20

Es wurden ausschließlich die üblichen Reagenzien des TRAK-Assays® der Anmelderin verwendet. Diese waren im einzelnen

25

A: 125I-TSH-Präparat als Tracer, und zwar in Form eines aus Rinderhypophysen isolierten und gemäß Patent DE 42 37 430 gereinigten und radiojodierten TSH-Präparats, im Kit vorliegend in Form von Fläschchen à 40 kBq, gebrauchsfertig in 5,5 ml;

30

B: TSH-Rezeptor (aus Schilddrüsen vom Schwein isoliert gemäß der Arbeitsvorschrift in Patent DE 42 37 430 bzw. im o.g. Artikel von Bernard Rees Smith and Reginald Hall in: Methods in Enzymology, Vol. 74 (1981), S. 405-420), vorliegend in Fläschchen mit einem Lyophilisat, das in 1,5 ml Puffer gemäß C zu rekonstituieren ist.

35

C: Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung) zur Rekonstitu-

11

ierung des lyophilisierten TSH-Rezeptors (Reagenz B), Fläschchen à 10,5 ml, gebrauchsfertig;

D: Fällungsreagenz, Flasche à 105 ml gebrauchsfertig, in Form einer 16%-igen Polyethylenglykol-Lösung.

Außerdem enthält der Kit noch Standards (bTSH) in Humanserum in Form von 6 gebrauchsfertigen Fläschchen à 0,5 ml zur Erstellung der Standardkurven, sowie zwei Kontrolseren in Humanserum.

2. Bestimmungen

5

10

25

Unter Verwendung der genannten Reagenzien wurden 100 Patienten-Seren vermessen, und zwar jeweils einmal unter Befolgung
der in der herkömmlichen Arbeitsanleitung vorgeschriebenen
Pipettier- und Inkubationsschritte, einschließlich der
vorgeschriebenen Vorinkubation, sowie ein weiteres Mal nach
dem erfindungsgemäßen Pipettierschema mit nur einer einzigen
Inkubation.

Genauer gesagt, werden bei jeder nach dem erfindunsgemäßen Verfahren durchgeführten Messung zuerst Serumproben bzw. Standards und Kontrollseren in übliche Teströhrchen pipettiert, danach wird direkt die Tracerlösung (A) zupipettiert, und anschließend wird der rekonstituierte solubilisierte TSH-Rezeptor (B/C) zupipettiert.

Es zeigte sich, daß die Ergebnisse, die in beiden Fällen erhalten wurden, als weitgehend identisch angesehen werden können.

Die Ergebnisse sind graphisch in Figur 1 dargestellt.

Für die Korrelation des herkömmlichen zweistufigen Verfahrens mit dem erfindungsgemäßen einstufigen Verfahren wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,97 bei einer Steigung von

0,96 ermittelt.

5

10

15

20

25

Figur 2 zeigt, daß die Standardkurven für das Bestimmungsverfahren bei herkömmlicher Testdurchführung und bei erfindungsgemäßer Testdurchführung als praktisch identisch angesehen werden können.

Auch wenn die Durchführbarkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung der konkreten Bestandteile des TRAK-Assays der Anmelderin gezeigt wurde, geht diese davon aus, daß das erfindungsgemäße Verfahren auch mit auf modifizierte Weise erhaltenen Reagenzien mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt werden kann. So kann beispielsweise anstelle des im TRAK-Assay® verwendeten solubilisierten porcinen TSH-Rezeptors auch ein solubilisierter rekombinanter TSH-Rezeptor verwendet werden, wie er in der obigen Veröffentlichung von S. Costagliola et al. beschrieben und als äquivalent zu dem solubilisierten porcinen TSH-Rezeptor des TRAK-Assays gezeigt wurde.

Es ist ferner für das erfindungsgemäße Verfahren nicht wesentlich, auf welche Weise nach der Inkubation der Reaktionsmischung die Trennung der umgesetzten TSH-Rezeptoren von der flüssigen Reaktionsmischung erfolgt. Anstelle der üblichen PEG-Fällung können somit auch andere an sich bekannte Verfahren zur Fest-Flüssig-Trennung zur Anwendung kommen, ohne daß das auf die vorgeschaltete Umsetzung in der Reaktionsmischung einen Einfluß hätte.

15

30

Patentansprüche

- 1. Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer humanen Serum- oder Plasmaprobe, bei
 dem man die zu bestimmenden Autoantikörper der Probe mit
 einem mit einem geeigneten Label markierten TSH-Präparat um
 die Bindungsstellen eines solubilisierten TSH-Rezeptors
 konkurrieren läßt und anhand der Menge des an diesen TSHRezeptor gebundenen Labels auf die Menge der zu bestimmenden
 Autoantikörper zurückrechnet, wobei das Verfahren die
 Schritte umfaßt
 - Inkubieren einer Reaktionsmischung, die den TSH-Rezeptor, markiertes TSH sowie die Probe enthält,
 - Überführen des TSH-Rezeptors mit den daran gebundenen Anteilen an anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern und markiertem TSH in eine feste Phase und deren Abtrennung von der flüssigen Phase, und
- Messung der Menge des in der festen Phase gebundenen markierten TSH anhand der für das verwendete Label typischen physikalischen oder chemischen Nachweismethode, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Bereitung der Reaktionsmischung die Probe, das markierte TSH-Präparat und den TSH-Rezeptor im wesentlichen gleichzeitig zusammengibt und die so erhaltene Reaktionsmischung einer einstufigen Inkubation unterwirft.
 - 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Bereitung der Reaktionsmischung zuerst die Probe und das markierte TSH-Präparat zusammengibt und die Reaktion durch anschließende Zugabe des TSH-Rezeptors started.
- 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als TSH-Rezeptor ein durch Extraktion und
 Solubilisierung aus einem humanen oder tierischen Schilddrüsenmaterial gewonnenes TSH-Rezeptor-Präparat oder einen

14

solubilisierten rekombinanten TSH-Rezeptor verwendet.

5

10

15

30

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man ein porcines TSH-Rezeptor-Präparat oder einen rekombinanten humanen TSH-Rezeptor verwendet.

- 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als markiertes TSH ein radioaktiv markiertes TSH verwendet, das durch direkte Radioiodierung eines durch Aufreinigung aus crudem bovinem TSH gewonnenen TSH-Präparats, das eine biologischen Aktivität von mehr als 40 IE TSH/mg Protein aufweist und erhältlich ist durch affinitätschromatographische Reinigung von handelsüblichem crudem bovinem TSH an einer anti-TSH-Antikörper-Säule und anschließende Ionenaustausch-Chromatographie an einem schwach sauren Kationenaustauscher mit endständigen Carboxylgruppen auf der Basis eines polyamidbeschichteten Kieselgels, erhalten wurde.
- 6. Verfahren nach einem der vorausgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den TSH-Rezeptor mit den daran gebundenen Anteilen an anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern und markiertem TSH durch an sich bekannte PEG-Fällung und anschließende Zentrifugation von der flüssigen Phase der Reaktionsmischung abtrennt.
 - 7. Verfahren zur Bestimmung von Anti-TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer humanen Serum- oder Plasmaprobe, bei dem man
- die zu bestimmenden Autoantikörper der Probe mit einem TSH-Präparat um die Bindungsstellen eines solubilisierten TSH-Rezeptors konkurrieren läßt, indem man eine Reaktionsmischung, die den TSH-Rezeptor, das TSH-Präparat sowie die Probe enthält, unter geeigneten Bedingungen inkubiert, den nicht an den TSH-Rezeptor gebundenen Anteil des TSH-Präparats an eine Festphase bindet und markiert, und

15

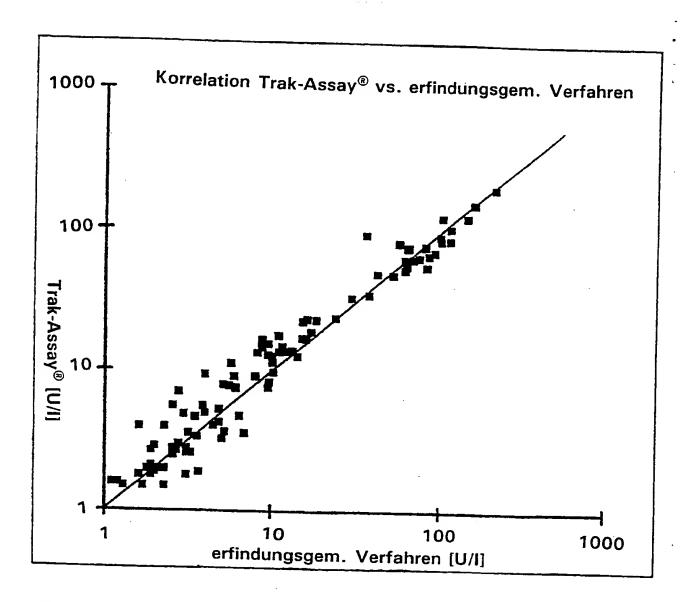
- anhand der Menge der an die feste Phase gebundenen Markierung auf die Menge der zu bestimmenden Autoantikörper in der Probe zurückrechnet,

dadurch gekennzeichnet, daß man zur Bereitung der Reaktionsmischung die Probe, das markierte TSH-Präparat und den TSH-Rezeptor im wesentlichen gleichzeitig zusammengibt und die so erhaltene Reaktionsmischung einer einstufigen Inkubation unterwirft.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Bereitung der Reaktionsmischung für die Inkubation zuerst die Probe und das markierte TSH-Präparat zusammengibt und die Reaktion durch anschließende Zugabe des TSH-Rezeptors started.

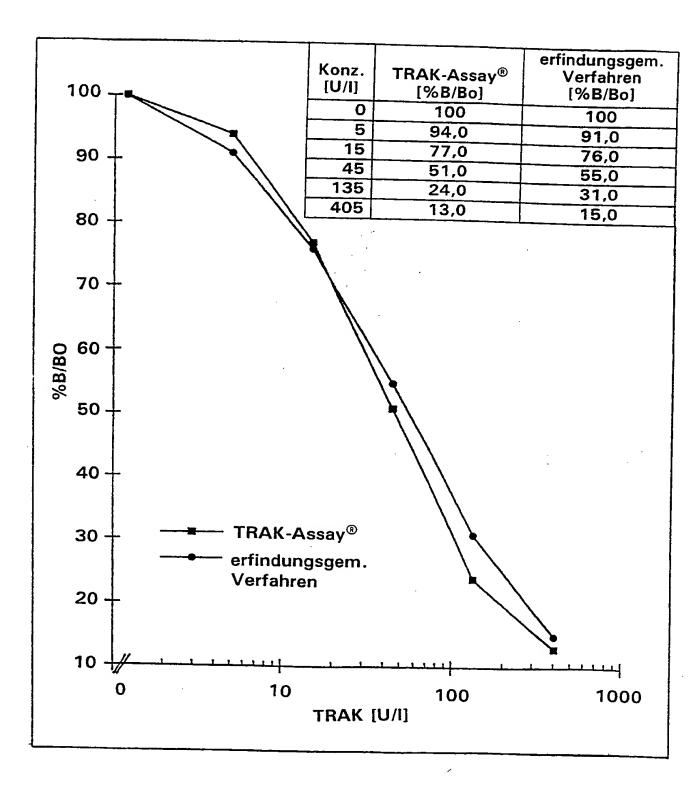
5

15



Korrelationskoeffizient = 0,97
Steigung = 0,96
n (Anzahl der Seren) = 100

Figur 1



Figur 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

		PC1, EP 9	0/02049
A. CLASS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/566 G01N33/76 G01N3	3/564	
According	to International Patent Classification (IPC) or to both national c	lassification and IPC	
	S SEARCHED		
IPC 6	documentation scarched (classification system followed by class $GO1N$	fication symbols)	
Document	ation searched other than minimum documentation to the extent	that such documents are included in the field	· ·
Electronic	data base consulted during the international search (name of data	I base and, where practical, search terms used	
c. Docui	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of t	he relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,95 06258 (HENNING BERLIN A BERGMANN & S. KORNFELD) 2 March see page 19, line 18 - line 20	h 1995	1-8
	see page 21, line 20 - line 23	-	
			!
	·		
Fur	ther documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed	l in annex.
* Special ca	ategories of cited documents:	"T" later document published after the in	ternational filing date
coura	nent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance	or priority date and not in conflict we cited to understand the principle or invention	with the application but
'L' docum	ent which may throw doubts on priority claim(s) or	"X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the d	ot be considered to
O docum	is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified) nent referring to an oral disclosure, use, exhibition or	"Y" document of particular relevance; the cannot be considered to involve an a document is combined with one or a	e claimed invention inventive step when the
"P" docum	means nent published prior to the international filing date but than the priority date claimed	ments, such combination being obvi in the art. "&" document member of the same pater	•
Date of the	actual completion of the international search	Date of mailing of the international	
1	1 November 1996	2 1. 11. 96	
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Van Bohemen, C	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT International Application No.

•	formation on patent family members			PC1, EP 96/02649		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date		
WO-A-9506258	02-03-95	DE-C- EP-A-	4328070 0724726	24-11-94 07-08-96		
	•			٠		

INTERNATIONALER RECHERCHENDERICH Internationales Aktenzeichen PC\, EP 96/02649 A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES 1 PK 6 G01N33/566 G01N33/76 G01 GO1N33/564 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 GO1N Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. WO,A,95 06258 (HENNING BERLIN ANLAGEN, BERGMANN & S. KORNFELD) 2.März 1995 1-8 siehe Seite 19, Zeile 18 - Zeile 20; Abbildung 1 siehe Seite 21, Zeile 20 - Zeile 23 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden ausgeführt)

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweiselhast erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung getracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Fax (+31-70) 340-3016

21. 11. 98

11.November 1996

Bevollmächtigter Bediensteter

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Van Bohemen, C

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

Х

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichu

, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PC1, EP 96/02649

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO-A-9506258	02-03-95	DE-C- EP-A-	4328070 0724726	24-11-94 07-08-96	

		÷			
			,		
				•	

THIS PAGE BLANK (USPTO)